

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-503950

⑬ 公表 平成4年(1992)7月16日

⑭ Int. Cl.

C 07 H 7/027
A 61 K 31/70
B 01 D 15/04

識別記号

ADS

庁内整理番号

7822-4C
8317-4C
8014-4D※

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門 (区分) 3 (2)

(全 10 頁)

⑮ 発明の名称 平滑筋細胞増殖のインヒビターとしてのヘパリン断片

⑯ 特 願 平2-501865

⑰ 出 願 平1(1989)12月14日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)6月14日

⑲ 国際出願 PCT/US89/05559

⑳ 国際公開番号 WO90/06755

㉑ 国際公開日 平2(1990)6月28日

優先権主張 ㉒ 1988年12月15日 ㉓ 米国 (U S) ㉔ 285,546

㉕ 発 明 者 ブランドリー, プライアン ケ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミダ, オーテイス
ドライブ 3215

㉖ 出 願 人 グリコメド インコーポレイテ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミダ, アトランテ
ッド イツク アベニュー 860

㉗ 代 理 人 弁理士 山本 秀策

㉘ 指 定 国 AT (広域特許), AU, BE (広域特許), BR, CH (広域特許), DE (広域特許), DK, ES (広域特許), FR
(広域特許), GB (広域特許), IT (広域特許), JP, LU (広域特許), NL (広域特許), NO, SE (広域特
許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 平滑筋細胞の増殖を防止または抑制するのに有用なグリコサミノグリコシド (GAG) を調製する方法であって、哺乳類のヘパリン/ヘパラン硫酸の亜硫酸による完全脱重合により得られる混合物を、分子サイズに従って断片に分離する工程、および

四糖単位である断片が主として含有される、混合物のサイズ画分を回収すること、を包含する方法。

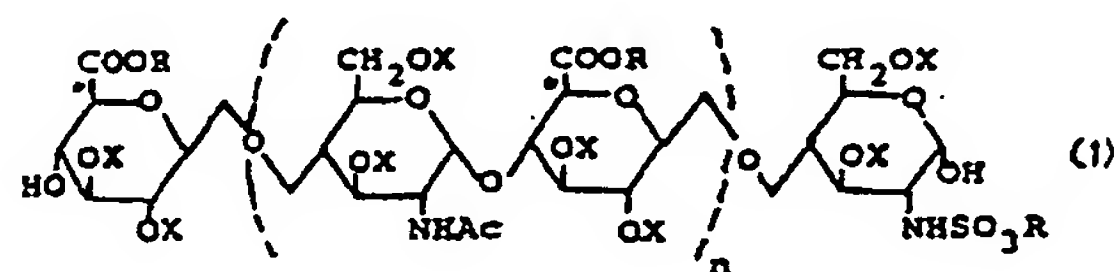
2. 請求項1に記載の方法であって、バイオゲルP2を含むカラムを用い、そして15% V/Vの酢酸で溶出することによるゲル濾過により、前記断片が分離される、方法。

3. 請求項1に記載の方法により調製されるGAG組成物。

4. 請求項3に記載のオリゴ糖と特異的に免疫反応性を有し、哺乳動物を前記組成物により免疫することを包含するプロセスにより調製される、抗体。

5. 亜硫酸分解により完全に脱重合させたヘパリンから単離され得る化合物であって、平滑筋細胞の増殖を防止または抑制し得る、六糖、五糖、四糖、三糖または二糖、またはそれらの塩である、化合物。

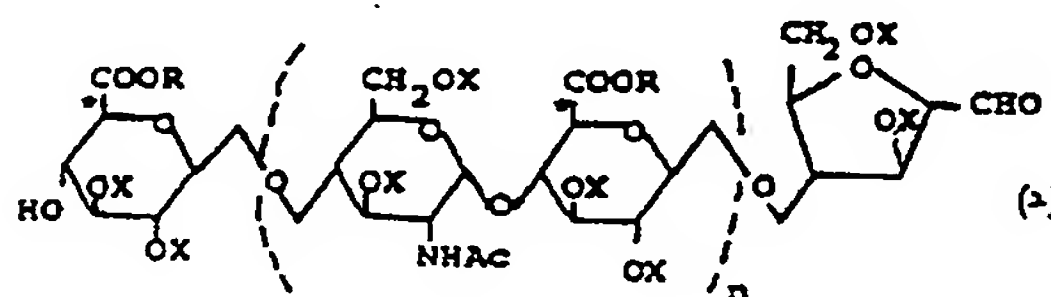
6. 請求項5に記載の化合物であって、次式(1)を有する化合物、または還元または非還元末端の糖が除去されている式(1)の化合物:



ここでnは0-2、RはHまたはカオチン、XはHまたはSO₃R、そして、Acはアシル(2-5C)であり、そして*はそれがついているC(5位の炭素)がRまたはS配置であり得ることを示す。

7. nが1である請求項6に記載の化合物。

8. 請求項5に記載の化合物であって、次式(2)を有する化合物、または還元または非還元末端の糖が除去されている式(2)の化合物:



ここでnは0-2、RはHまたはカオチン、XはHまたはSO₃R、そして、Acはアシル(2-5C)であり、そして*はそれがついているC(5位の炭素)がRまたはS配置であり得ることを示す。

9. n が 1 である請求項 8 に記載の化合物。

10. 平滑筋細胞の望まない増殖により特徴づけられる状態を処置するのに有用な薬剤組成物であって、請求項 3 または 5 から 9 の効果的な量の化合物を、少なくとも 1 種の薬学的に受容され得る賦形剤と混合して含有する、組成物。

11. 哺乳動物被検体において抗増殖性 G A G が不足していることあるいは過剰であることを診断する方法であって、該被検体由来の生物学的試料の、請求項 3 または 5 から 9 の損傷された化合物との免疫反応において、競合する G A G のレベルを評価すること、を包含する方法。

12. 請求項 3 または 5 から 9 に記載の化合物と特異的に免疫反応性を有し、哺乳動物を前記化合物により免疫することを包含するプロセスにより調製される、抗体。

13. 生物学的試料の抗増殖性ファクターのレベルを定量する方法であって、該試料を請求項 4 または 12 の抗体で処理すること、および該試料が結合した抗体の量を検出すること、を包含する方法。

14. 透析膜により保持される無機イオンから有機イオンを分離する方法であって、

該無機イオンが吸着しない条件下において、有機イオンをイオン交換樹脂に吸着させる工程；

有機溶媒、または透析膜により保持されないイオンを含む塩を用いて、該樹脂から有機イオンを溶出させ、溶出画分を得る工程；および

該有機イオンを含む溶出画分を透析にかける工程；を包含する方法。

15. 請求項 1 4 に記載の方法であって、前記有機イオンが硫酸塩であり、そして前記有機イオンが硫酸化された糖である、方法。

明細書

平滑筋細胞増殖のインヒビターとしての

ヘパリン断片

技術分野

本発明は、治療上および診断上有用な組成物としての純調製物に関する。特に本発明は、過剰な平滑筋細胞の増殖を特徴とする病態および症状を治療するための、四糖単位に相当する分子量を有するヘパリン誘導体に関する。

背景技術

血管壁における平滑筋細胞の増殖は、血管の損傷にตอบสนองして、および特定の病態の状態に関連して起こる (Austin, G. E. ら、J Am Coll Cardiol (1985) 5: 369-375)。この細胞の増殖は、不利な影響を与え得る。これは、例えばアテローム硬化、腎性高血圧症、肺性高血圧症、尿管炎、および術後の血管性の管腔狭窄化症 (vascular restenosis) のような病的な損傷を、細胞自身と共に形成する過剰の蛋白質あるいは他のマトリックス分子が生産されるためである。これらの結果は、血餅を特徴とする損傷に対する急性の応答とは異なっている。

グリコサミノグリカン (G A G) はヘキソサミンとアルドクロン酸が交互に連なった共重合体で、硫酸化した形で存在し、プロテオグリカンとして合成される。これらはムコ多糖と総称される。以下の文章で取り上げられる組成物について、ヘパリンおよびヘパラン硫酸は、ヘキソサミン/アルドクロ

ン酸の繰り返し単位を特徴として分類される G A G 系列の一員として意味され得る。例えば、コンドロイチン硫酸では、アルドクロン酸は主として、D-グルクロン酸で、ヘキソサミンは、アセチル化した 2-アミノ-2-デオキシ-D-ガラクトース (N-アセチルガラクトサミン、G a l N A c) である。デルマタン硫酸 (コンドロイチン硫酸 B) では、アルドクロン酸は主に、L-イズロン酸で、ヘキソサミンは、G a l N A c である。ケラテン硫酸では、アルドクロン酸は D-ガラクトースに置き換えられ、ヘキソサミンは、おもにアセチル化した 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース (N-アセチルグルコサミン、G l c N A c) である。本明細書中での重要な組成物であるヘパラン硫酸とヘパリンでは、ヘキソサミンは主に、アセチル化したおよび硫酸化したグルコサミン (G l c N H₂) であり、アルドクロン酸は、ヘパリンでは主に L-イズロン酸であり、ヘパラン硫酸では主に D-グルクロン酸である。ヘパラン硫酸は、通常、ヘパリンよりもグルクロン酸を高い割合で含んでいると考えられている。

組織から分離したヘパラン硫酸あるいはヘパリンの調製物の不均一性の問題により、はっきりした区別が困難になっている。以下に説明するように、これらのオリゴ糖類は、生合成の経路に関係しているためである。従来のヘパリン (抗凝固剤として用いられている) は、5-25 k d の分子量を有し、そして従来法により、様々な長の鎖の混合物として抽出される。これらの方法は、ウシおよびブタの肺、腸、あるいは

は肝臓のような適当な組織の自己分解および抽出、ならびに多糖類以外の構成成分の除去を含む。

抽出物中の糖の分子量は、組織中で合成されるヘパリンプロテオグリカンの多糖類として存在することが知られている60-100kdより有意に少ない。GAG部分は、Xyl-Gal-Gal-D-GlcA-配列の四糖の結合領域とペプチドマトリックスのセリン残基が結合し、次にナシロス残基にGlcNAcとD-グルクロン酸とを交互に付加して伸長させることにより合成される。この多糖の側鎖は、以下のことを連続的に行う一連の酵素によって修飾される。すなわち、N-アセチルグルコサミンの脱アセチル、アセチル基の硫酸基による置き換え、D-グルクロン酸残基のC5の水酸基のエピマー化（これをL-イズロン酸にして、GAG鎖をヘパラン型からヘパリン型へ変える）、その結果生じたL-イズロン酸のO-2の硫酸化、および次にグルコサミン残基のO-6の硫酸化である。更にヘパランあるいはヘパリンのどちらかの段階で、グルコサミン残基のO-3が硫酸化される類もある。この追加の硫酸化が、抗血栓（抗凝血）活性の活性部位と関連している。他の化学的に可能な硫酸化部位は、L-イズロン酸あるいはD-グルクロン酸のO-3およびD-グルクロン酸のO-2であるが、これらはめったに見られない。

明らかに化学的に類似性があるため、分離された「ヘパリン」は、そうでなければヘパラン硫酸として分類される物を、

かなりの量で含有し得る。

ヘパリン/ヘパラン硫酸鎖の脱重合およびその産物の大きさ別の分離に関しては、広範囲な技術がある。特に関連しているのは、2, 5-アンヒドロマンノースの還元末端が、還元され、対応する2, 5-アンヒドロマンニトールになった後に構造決定された結果を開示しているGuo, Y. ら、Anal Biochem (1988) 168: 54-62の報告である。

次の四糖は、とくにGuoによって挙げられた。これらの代表的な糖を次の略字を用いて表す：D-グルクロン酸=GlcA；L-イズロン酸=IdoA；D-グルコサミン=GlcNH₂；N-アセチル-D-グルコサミン=GlcNAc；D-グルコサミンN-硫酸塩=GlcNS；2, 5-アンヒドロマンノース=Man(2, 5)；2, 5-アンヒドロマンニトール=ManH(2, 5)。O結合硫酸残基の位置は、「S」および、硫酸化の位置番号で示されており、そこでSO₃R残基が酸素と結合している。下記の指示において、αおよびβのアノマー結合は、従来ヘパリンにおいて判っているものであり、上記に示されているDあるいはL配位に関連している。硫酸基の位置は、それを付加した糖の略字の下に示している。

(以下余白)

GlcA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
2S

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
6S

GlcA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
6S

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
6S 3S

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
6S 6S

IdoA - RC - IdoA - ManH(2,5);
2S 6S 2S

IdoA - GlcNAc - GlcA - ManH(2,5);
6S 3S, 6S

IdoA - RC - IdoA - ManH(2,5)
6S 2S 6S

(RCは、ManH(2, 5)に相似性の環化した形(ring contracted form)を表している；この形は、生じた中間体のヘミアセチルが還元されたときに形成されと考えられている。)

平滑筋増殖にヘパリンあるいはヘパラン硫酸あるいは、そ

れらの分解産物が関連していることが、ときどき認識されている。ヘパリンおよびヘパラン硫酸は、本明細書で前述したような損傷に関連する血管の増殖を、遅らせ得るかあるいは抑え得る(Clowses, A. W. ら、Nature (1977) 265: 625-626)。平滑筋増殖におけるヘパラン硫酸およびヘパリンの影響もまたMarcum, J. A. ら、Biology of Proteoglycan Academic Press, 1987, pp 301-343に述べられている。血管平滑筋細胞の成長のヘパリンによる阻害もさらに、Castellot, J. J. Jr. ら、J Biol Chem (1982) 257: 11256-11260に述べられた。胎児の組織の血管平滑筋細胞の成長に対するヘパリンの影響は、Benitz, W. E. ら、J Cell Physiol (1986) 127: 1-7に述べられた。血管の周囲細胞および平滑筋細胞の両方の増殖のインヒビターとしてのヘパリンの効果は、Orlidge A. ら、Microvascular Research (1986) 31: 41-53に示された。彼らは、コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸には、この効果がないことも更に示した。ヘパリンおよびヘパラン硫酸の平滑筋細胞の増殖に及ぼす影響の総説は、Benitz W. E. の "The Pulmonary Circulation: Normal and Abnormal" (Fishman, A. P. 編集ペンシルバニア大学出版、1988)に

述べられている。

このようなグリコサミノグリカンが、どのような機構によって機能し、あるいは上皮組織成長因子および繊維芽細胞成長因子のような他の成長因子と、どの程度相互作用するのかについては明かではない。少なくとも5つの糖を有するオリゴ糖の8-Oの硫酸が、このプロセスにおいて重要なのではないかとされている(Castellioら、J Cell Biol (1986) 102: 1979-1984)。

現在、平滑筋細胞に関する抗増殖活性の上昇は、ヘパリンあるいはヘパラン硫酸GAGsのより小さいオリゴ糖部分と関連しているということが判ってきた。

発明の開示

本発明は、平滑筋細胞に関して、より優れた特異的な抗増殖活性を有する低分子量のグリコサミノグリカン(GAG)を提供する。低分子量のGAGに存在するこの活性により、有効な薬学上の組成物としての契機が提供される。この組成物は、天然物からの該組成物の分離により調製され得、あるいはひとたびGAGの正確な構造が判れば、合成され得る。

従って、ある面で本発明は、抗増殖活性を有するヘパリン/ヘパラン硫酸のGAGサブユニットを調製するプロセスに向けられる。そのプロセスは、ヘパリン/ヘパラン硫酸の脱重合化が實質的に完了した物から構成される混合物の構成成分を、大きさに別に分離し、そして四糖の特徴的な分子量に相当する部分を回収することを包含する。本発明はまた、この

特徴的なD-グルクロン酸(GlcA)残基およびヘパリンに特徴的なイズロン酸(IdoA)を含有し得る。前出の背景技術のところで述べた通り、D-グルクロン酸からL-イズロン酸への変換は、ヘパラン型中間体の5位の炭素のエピマー化の結果である。図1は、工程の流れを示しており、図1を参照すれば、この関係が明らかになる。全ての交換がなされていない範囲では、ヘパラン硫酸の特性は、その調製物の中に残る。ヘパリンの調製物のポリマー鎖の正確な性質は、一般的に決定されていないため、そして、調製物によってそれぞれ異なっているため、用語「ヘパリン/ヘパラン硫酸」は、偶然にできてくる混合物の範囲を満たすものとする。

「ヘパリン/ヘパラン硫酸」調製物は、もし所望であれば、ヒトの組織も含めて、様々な哺乳動物の組織から得られる。一般的に、ブタあるいはウシ由来の物が用いられ、血管の組織が好ましい。ヘパリン/ヘパラン硫酸の源として好ましい出発材料は、ブタの腸の粘膜であり、この組織から調製され、「ヘパリン」と表示されている調製物が市販されている。一般的に、ヘパリン/ヘパラン硫酸の出発材料は、選択した組織を、自己分解およびアルカリ抽出させた後に蛋白質を凝固させ、次に酸性化により上清からヘパリン-蛋白質複合体を沈殿させて調製する。この複合体は、エタノールあるいはアセトンあるいはそれらの混合物のような非水系極性溶媒で、再度沈殿して回収する。そして、脂質は、エタノールのような有機溶媒による抽出で除去し、蛋白質はトリプシンのよう

ようにして得られたGAG組成物に向けられる。

他の面では、本発明は、本発明のGAG組成物に対して免疫特異性のあるモノクローナル抗体を含む抗体、およびこれらの抗体との反応により、活性GAGのレベルを測定する方法に向けられる。他の面では、本発明は、平滑筋細胞の増殖を調節するのに有用な、GAG調製物あるいはその抗体の治療用の組成物に向けられる。

更に別の面で、本発明は、透析不可能な無機塩の混入物から、低分子量の有機塩を分離する方法に関する。この方法は、無機塩を除くために有機塩をイオン交換カラムに吸着させ、透析可能な塩で溶出することを包含する。

図面の簡単な説明

図1は、ヘパラン硫酸およびヘパリンの生合成の工程、ならびにそれらの相互関係を示す。

図2は、脱重合したヘパリン調製物を、バイオゲルP2ゲル濾過カラムで分析を行ったときの典型的な溶出パターンを示す。

図3は、本発明の組成物のインビトロアッセイにおける抗増殖活性を示す。

本発明の実施例

「ヘパリン/ヘパラン硫酸」とは、ヘパリンを抗血液凝固剤として調製していた従来の方法で組織から得るか、あるいはそうでなければ、組織から得られるものに相当するように合成した調製物を意味する。この調製物は、ヘパラン硫酸に

な蛋白質分解酵素による処理で除去する。ヘパリン出発材料の調製の適当な手順は、例えば、Charles, A. F. ら、Biochem J (1938) 30: 1927-1933に載っている。そして、この基本的な手順の改良法も既に知られており、例えば、Coyne, E. の、Chemistry and Biology of Heparin (Elsevier Publishers, North Holland, New York, Lunblad, R. L. ら、編集(1981))に開示されている。

好ましくは、出発材料として用いられるヘパリン/ヘパラン硫酸調製物は、まず、エタノールやアセトンのようなヘパリンが溶解しない溶媒での抽出によって精製する。次に精製した出発材料を、脱重合する。

脱重合には、例えば、亜硝酸、ヘパリナーゼ、あるいは過ヨウ素酸塩、好ましくは、亜硝酸のような様々な試薬を用い得る。本発明の分解産物は、酸性条件下で、亜硝酸分解を完了したときに得られるものに相当する。代表的な手順では、亜硝酸は、冷酸性溶液中の亜硝酸ナトリウム溶液により、濃度0.01-0.1Mで、その場で調製される。そしてその試薬を、濃度10-100mg/ml、pH1-2、好ましくは1.5のヘパリンの処理に用いる。反応は室温で行い、反応が完了した時点で、必要に応じて、適当な試薬を加えることによって中和し得る。部分分解を行っただけの時とは明らかに異なった、独特の構成による構成成分の混合物が完全

分解によってできる。

したがって、分解混合物の様々な大きさになった断片の組成物は、分解の性質および程度によることは明かである。分解方法によって、結果として生ずる分裂の型が、分裂するところの結合場所で異なり得る。そして例えばヘパロン酸とグルクロン酸との間の結合、あるいは様々な硫酸化レベルの糖の間の結合の分裂の位置も異なる。したがって、主に回収された四糖混合物は、分裂がヘパリナーゼによるときと亜硝酸によるときとは、異なる組成物になり、そして部分脱重合化と完全脱重合化では異なる組成物になる。

「完全脱重合」とは、脱重合の程度を意味しており、本願の実施例1に記載の手順によって実施される脱重合工程から生じる脱重合の程度のことである。一方、ヘパリン/ヘパラン硫酸の原材料も使用され得、他の脱重合反応物も使用され得る。但し、この脱重合が、この手順を使用して分解が行われる際に得られる成分を生産し、抗増殖活性が高められた組成物が得られる場合に限られる。

従って、他の脱重合方法は、これらの活性成分を生産する限りにおいて、使用され得る。

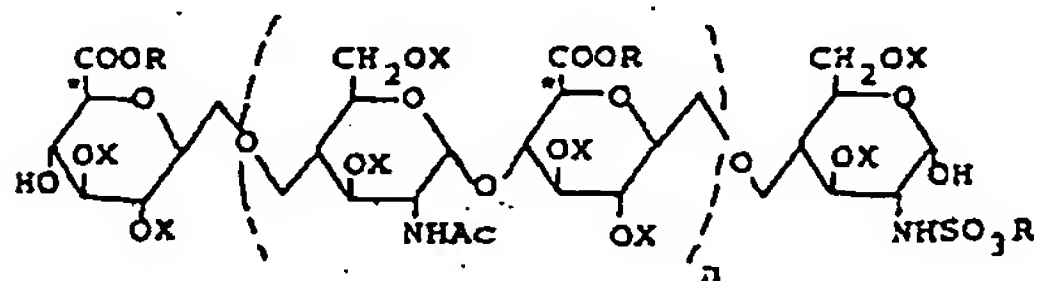
脱重合により、サイズに基づいて分離され得る断片の混合物が生産される。ゲル浸透、電気泳動、および薄層クロマトグラフィー、密度勾配遠心分離法を含む、サイズ分離の様々な技術が可能であって、特に、好ましいのは、約100から1800ダルトンの範囲の画分を使用した、セファデックスまたはゼ

使用され得る。

このことは、まず、DEAEのようなアニオン交換樹脂に反応混合物を吸着させることによって成し遂げられる。次いで、塩化ナトリウムのような透析膜を通過し得る低分子量の塩類を用いて洗浄および溶離する。溶離された画分は、改良された膜で透析され得る。従って、薬学上受け入れられる組成物は、塩類除去に有効な手段を用いるとさらに容易に調製される。

主として四糖単位を含有する画分は、平滑筋細胞の増殖阻害に高活性を示す。この特性の証明は、Castellot, J. J. Jr. ら、*J Cell Biol* (1986) 102:1979-1984に記載されているような標準的なアッセイを使用して得られ得る。Bonitz, W. E. ら、*J Cell Physiol* (1986) 121:1-7 (前記) のような他のアッセイ方法もまた使用され得る。

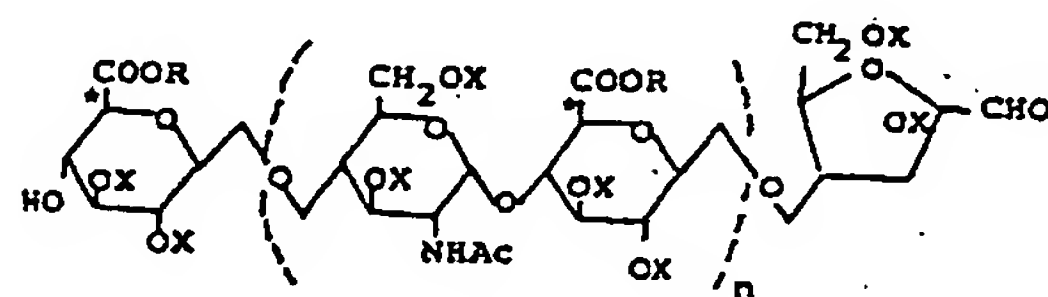
このようにして得られ得る本発明の化合物は、次式で表される：



リアクリルアミドゲルシステムによるゲル透過クロマトグラフィーである。特に好ましいゲル浸透樹脂は、バイオゲルP2であり、この方法を使用して分離を行って、二糖を含有する断片が、高分子量の四糖、五糖、六糖および多糖を含む断片から効果的に分離される。

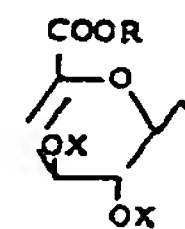
サイズ分離は、反応混合物を脱塩化前または脱塩化後のいずれかにおいて行われ得る。これまで、サイズ固分前に無機イオンの除去を行うことは不可能であった。なぜなら、これまで得られた透析膜は、脱重合反応において得られた低分子量の二糖および四糖を保有することができなかったためである。従って、例えば、酢酸のような揮発性溶剤を用いて吸着材料を溶離することによって、サイズ分離手順それ自身において、塩が除去された。

現在では、無機イオンが、サイズ分離前の透析によって除去され得る、あるいは、塩が、サイズ分離における溶離媒体として使用されることが分かった。一部には、この可能性は、塩素イオンのサイズ範囲であるイオンから、四糖または二糖を分離させ得る透析膜が、最近得られたことに起因する。これらの膜は直接使用され得ない。なぜなら、混入イオンは硫酸イオンであり、これらの膜も硫酸塩を保有しているため、すなわち、これらの膜は、硫酸イオンを四糖から分離させることができないためである。従って、硫酸イオンが反応混合物から除去され得、例えば、塩素イオンに置換され得る場合には、透析は、これらの小さい有機イオンを除去するために



ここで、 n は0-2、 R はHまたはカチオン、 X はBまたは SO_3R 、 Ac はアシル (2-5C)、好ましくはアセチル (Ac^4)、および、関与するC (炭素5) がBまたはS型のいずれかであり得ることを示す。いずれかの末端糖が欠失している、奇数の糖残基を有する糖構造もまた含まれる。

式(2)の化合物において、還元末端における糖は、脱アミノ化されて、示されるように、2,5-アンヒドロマンノースを形成する。この化合物をさらに還元すると、CHOは、 $-CH_2OH$ となるが、この還元は、脱重合反応自身においては起こらない。非還元末端糖が4,5-不飽和型である形態、すなわち、



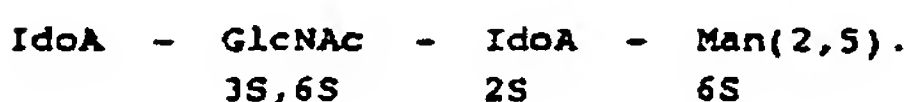
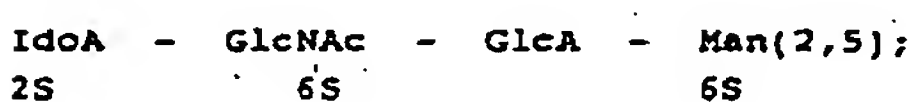
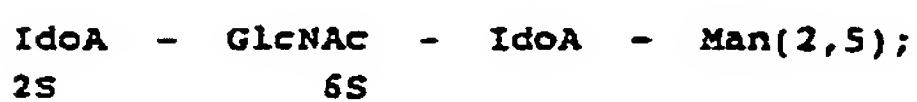
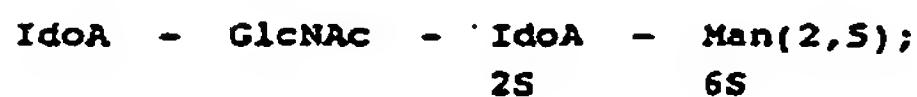
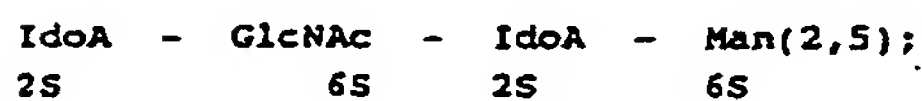
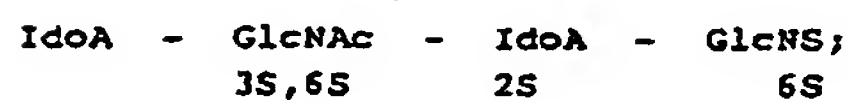
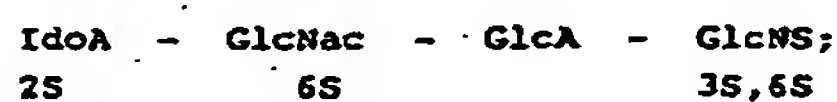
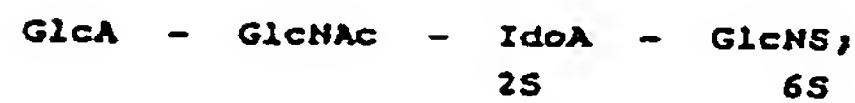
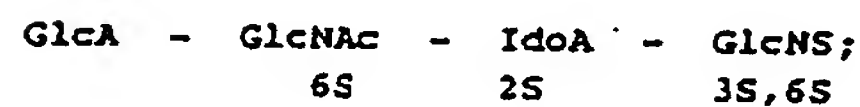
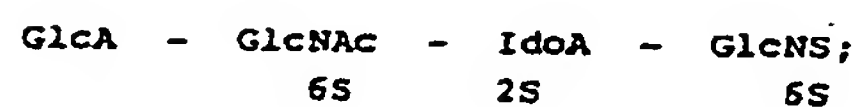
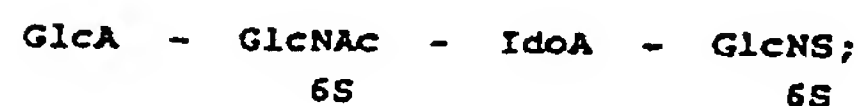
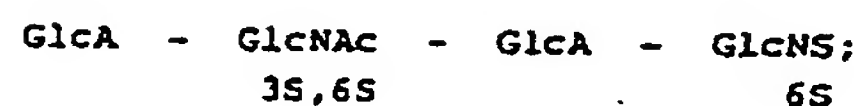
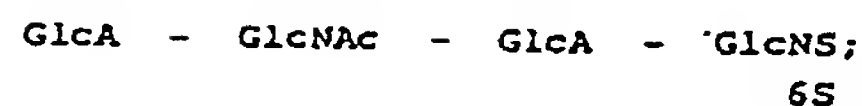
もまた含まれる。しかし、これは亜硝酸による分解から生じ

るものではない。亜硝酸による消化は、N-硫酸化グルコサミンの開裂に特異的である。従って、二糖よりも長い鎖の完全な消化産物は、非硫酸化グルコサミンを含有しなければならぬ。

特に好ましい実施態様において、nは1である。Rによって示されるカチオンは、ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはアンモニウムイオンのような無機カチオン、あるいは四級アミンから得られるような有機カチオンであり得、これらの塩類は、簡単な中和によって形成される。

Rが上記のようである、本発明の代表的な化合物を以下に示す。これらの代表例において、以下の略語が使用される。D-グルクロン酸=GlcA; L-イズロン酸=IdoA; D-グルコサミン=GlcNH₂; N-アセチル-D-グルコサミン=GlcNAc; D-グルコサミン N-硫酸=GlcnS; 2,5-アンヒドロマンノース=Man(2,5); 2,5-アンヒドロマニトール=ManH(2,5)。Sおよび硫酸化されている位置の番号で示される。その番号の位置の所でSO₃RがOに結合している。以下の表示の中には、上記式1に示されるようにであり、αおよびβアノマー結合およびDまたはL型もある。硫酸塩の位置は、硫酸塩が付いている糖の略語の下に示されている。

(以下余白)



これらの代表的な化合物の様々な他のレベルの硫酸化もまた含まれる。さらに、二糖、三糖、五糖および六糖の、これらの構造の変形されたものも本発明に含まれる。

抗体の調製

主として四糖単位断片を含む分離組成物は、組成物の成分と免疫反応する抗体の生産を刺激するのに使用され得る。ウサギ、ラット、マウスおよびヒツジ等の様々な哺乳類中の四糖組成物を主として使用する標準免疫方法によると、組成物成分と免疫反応する血清が得られる。組成物は、免疫原性を高めるために、適当な血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンのような適切な、抗原的に中性のキャリアーとうまく結合される。さらに、免疫化された哺乳類の抗体分泌細胞は、モノクローナル抗体のパネルを生産するように永久増殖化され得る。次いでこのパネルは、組成物と反応するものについてスクリーニングされる。ヘパリン多糖に対するモノクローナル抗体の調製方法は、本願で参考のために取り入れたPejler, G.ら、J Biol Chem (1988) 263:5197-5201によって説明される。

得られたポリクローナルまたはモノクローナル抗体調製物は、下記のように、生物サンプルにおける活性な抗増殖成分のレベルのアッセイおよび平滑筋細胞の増殖の過度の退化を防止するための受動療法において有用である。

有用性の説明

主として四糖断片を含有する、本発明のオリゴ糖組成物は、過度のおよび破壊的な平滑筋細胞増殖によって特徴づけられる疾病治療のための投与に有用である。これらの疾病は、しばしば、手術患者の場合のように、被検体が外傷にさらされ

である。

投与の他の形態は、あまり好ましくないが、より好都合である場合もある。静脈注射よりも少ない投与量の皮下注射、または静脈注射よりもわずかに多い投与量の経口投与、あるいは局部的創傷のための膜内外または経皮またはその他の局所投与もまた有効であり得る。血管移植片材料中に含まれる、支持マトリックス (supporting matrix) のような連続放出装置による局所投与は、外傷部への接近が可能である場合には、特に有用である。

上記の投与形態に適切な処方、当該技術分野に知られており、適切な処方の要約は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 最新版において見いだされる。

本発明の組成物はまた、放射標識、蛍光標識、発色団または酵素のような代表的な方法を使用して標識され得、生物サンプルにおける抗増殖成分の量を競合アッセイするのに使用され得る。生物サンプルにおける分析物を競合アッセイするのに適切な方法は、当該技術分野において既知であり、一般に、標識された競合物との混合物中で、代表的には、イムノグロブリンまたはその断片のような分析物と反応する特異的な検出パートナーを用いてサンプル処理することを含む。本発明によって調製された抗体は、この目的に有用である。分析物および競合物の抗体との結合は、結合複合体を除去し、複合体または上澄み液の標識をアッセイすることによって測

る際に発生する。創傷または手術によって生じる外傷は、血管損傷および二次的な平滑筋細胞増殖を引き起こし、この二次的な増殖は、血管性の網膜軟化症を引き起こす。この望ましくない結果は、血管移植片、心臓移植、バルーンまたはレーザー血管形成、動脈外傷、筋肉動脈の手術後の回復、動脈カテーテルの長期に渡る体内膨張、侵入動脈分析手法、腎臓、肺または肝臓移植、冠状動脈バイパス手術、頸動脈バイパス手術、大腸癌のひかがみバイパス手術、および頭蓋内の動脈バイパス手術後に発生し得る。

外傷の結果発生する二次的な平滑筋細胞増殖に加えて、特定の疾病が望ましくない血管増殖と関連している。但し、これらの場合にも、いくつかの未知の内傷が二次的な結果を引き起こしていると思われる。これらの疾病状態は、グッドパスターシンドローム (Goodpasture syndrome)、急性糸球体腎炎、新生児肺動脈性高血圧、喘息、充血性心臓疾患、成人肺動脈性高血圧、および腎臓血管性高血圧を含む。

これらの疾病治療には、適当量の本発明の組成物の投与が有用である。投与は、多糖組成物に適切な、通常の経路によるものであり、通常注射などによる組織投与を含む。特に好ましいのは静脈注射である。長時間に渡って連続的注射が容易に行われ得るためである。通常の投与範囲は、5日から15日、好ましくは7日から10日に渡って連続して、0.1から10 mg/kg/hrの範囲内である。特に好ましい投与量は、約0.5 mg/kg/hrあるいは体重70 kgの成人では、35 mg/hrまたは840 mg/day

定され得る。分離は、特異的結合パートナーを予め固体支持体に結合させることによってさらに容易に行うことができる。このような方法は、当該技術分野において既知であり、このような競合アッセイのために得られる方法は、非常にたくさんあり、また既知であるため、本願ではその詳細を省く。

本発明の抗体は、サンプル中の標識組成物と分析物の抗増殖因子の間の競合を伴う上記のタイプの免疫アッセイ、ならびに因子の直接免疫アッセイにおいて有用である。直接アッセイを伴うその他の方法もまた、様々な方法によってよく知られている。代表的には、抗体に結合する分析物は、標識を有する付加的な反応パートナーによる方法または他の検出方法によって検出される。従って、例えば、通常のサンドイッチアッセイにおいて、本発明の抗体の分析物に対する結合は、これらの同一抗体の標識調製物との反応、または異なる種の調製物との標識抗体免疫反応によって検出され得る。

本発明の抗体はまた、薬剤組成物を形成することが可能で、この結果が所望される被検体において、平滑筋細胞の増殖を刺激するのに使用され得る。

以下の実施例は、本発明を例示することを目的としており、本発明を限定するものではない。

実施例 I主として四糖である組成物の調製

市販のブタの腸粘膜ヘパリンを、約270 mg/mlになるように1 M NaCl中で溶解し、3倍容量の95%エタノールを加えること

によって沈澱させた。沈澱したヘパリンを、3,000 gで遠心分離にかけ、さらにもう2回分の沈澱物についても説明されるように、ペレットを回収し、再溶解および再沈澱させた。最終的に得られたヘパリンペレットを凍結乾燥させた。

亜硝酸反応物を調製するために、亜硝酸ナトリウムを、氷冷した0.24 Mクエン酸中で溶解し、0.08 M NO_2^- 溶液を得た。5部の亜硝酸試薬を、1部の300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン溶液に加えた。調製物を、室温になるまで放置し、1 M H_2SO_4 で滴定しpH 1.5にし、90°Cで1時間反応させた。スルファミン酸アンモニウムを0.5 Mになるように加えて反応を停止した。

得られた脱重合法ヘパリンを、15%V/V酢酸が充填された2.5 x 97 cm バイオゲルP2ゲル濾過用カラムにかけた。15%V/V酢酸による溶離を続け、画分を収集した。各画分におけるウロン酸の濃度は、Blitter, T.ら、*Anal Biochem* (1982) 4:330のカルバゾールアッセイによって決定した。

代表的な溶離特性を図2に示す。320 ml付近の(V₀/V₀ = 0.67)ピークの溶離画分は、主として四糖を含む。

主として四糖を含む混合物を含有する画分を凍結乾燥させて保存する。

実施例2

平滑筋増殖に対する効果

テストされる溶液を、10%の胎児ウシ血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地である、「完全培地」中で調製した。

害と同等のレベル、すなわちSMCの増殖を50%阻害する。

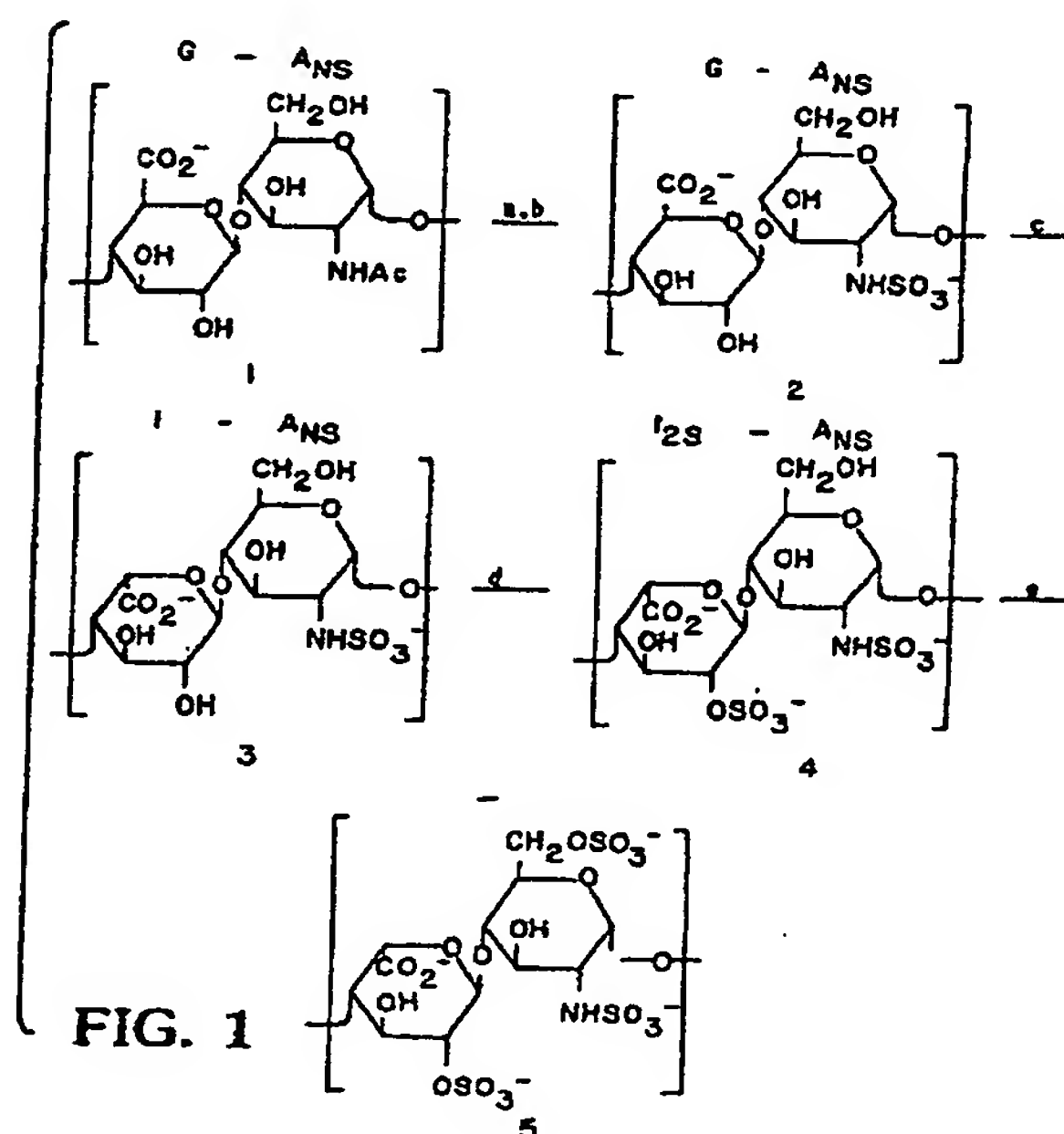
本発明の組成物のもう1つの調製物は、10から100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でSMC増殖を50%阻害した。

ウシ平滑筋細胞(SMC)を、Bonitz, W.B.ら、*J Cell Physiol* (1986) 127:1-7によってウシ肺動脈から単離した。継代3-10のSMCを、上記培地中の96ウェルマイクロタイタープレート中に1ウェル当たり350から700細胞を入れて、2から4時間付着させた。完全培地を、0.1%の胎児ウシ血清が供給されたDMEMで置き換え、細胞をさらに72時間インキュベートして、細胞増殖を停止した。低血清培地を、テストサンプルを含む完全培地に置き換えた。

細胞を、Brandley, B.ら、*J Biol Chem* (1987) 262:6431に記載されるように、一定の間隔でサンプルした複製プレートを使用して最高7日間増殖させた。細胞数は、培地を除去し、リン酸緩衝化生理食塩水で細胞を洗浄し、溶菌緩衝液を加えて、75から150 μl の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性をアッセイすることによって決定した。

このようなアッセイのうちの1つのアッセイの結果を、図3に示す。棒線#1および#5は対照物である。棒線#1は、GAGを含まない。棒線#5は、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコンドロイチン硫酸のテスト溶液を示す。棒線#4は、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販ヘパリンを含む。棒線#2および#3は、本発明の組成物を50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む。本発明の組成物が、増殖阻害する能力は、市販のヘパリンよりも優れている。

60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、実施例1において調製されたような本発明の組成物は、対照物と比較してSMCの増殖を90%阻害し、6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリンを使用して得られる増殖阻



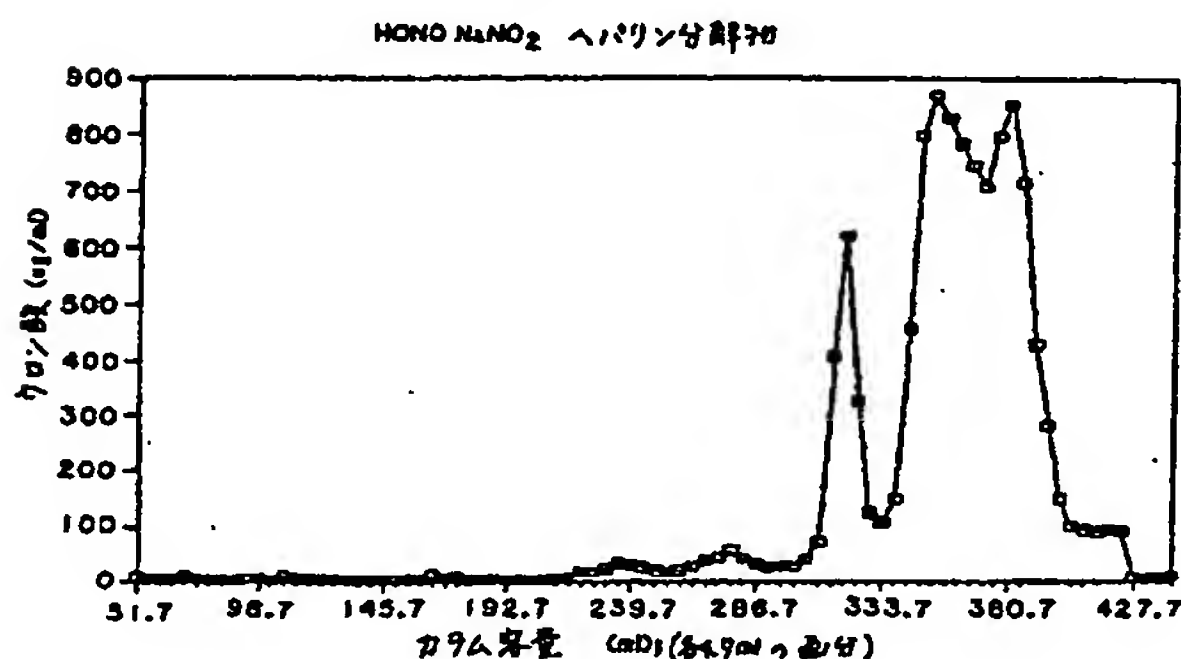
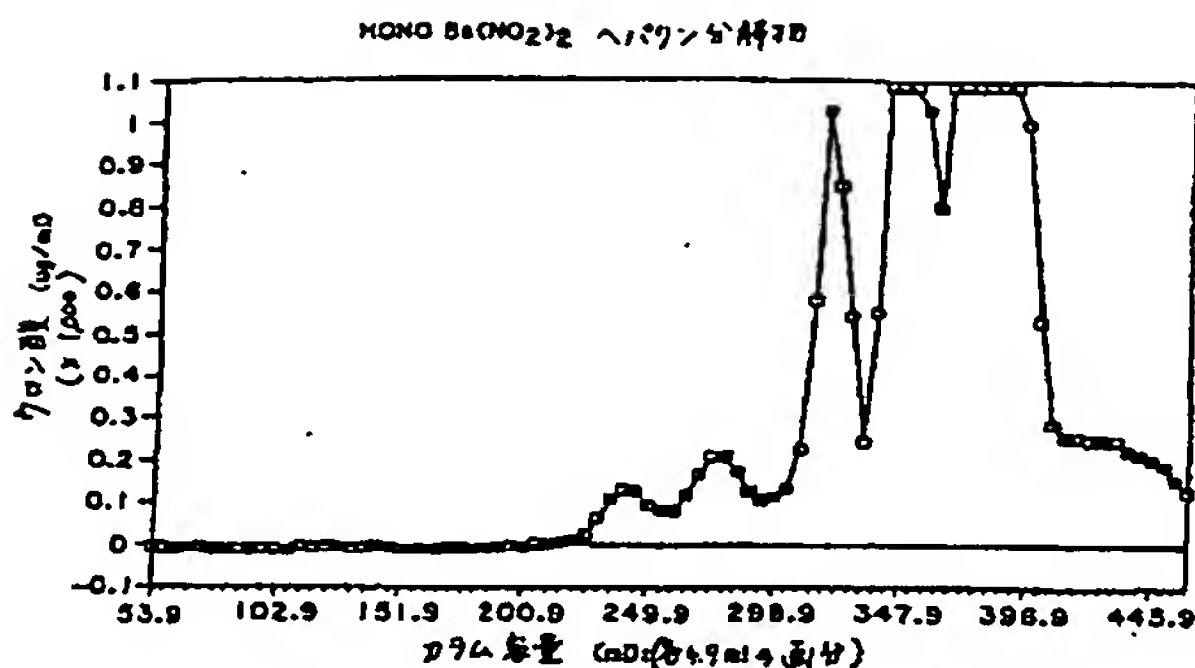
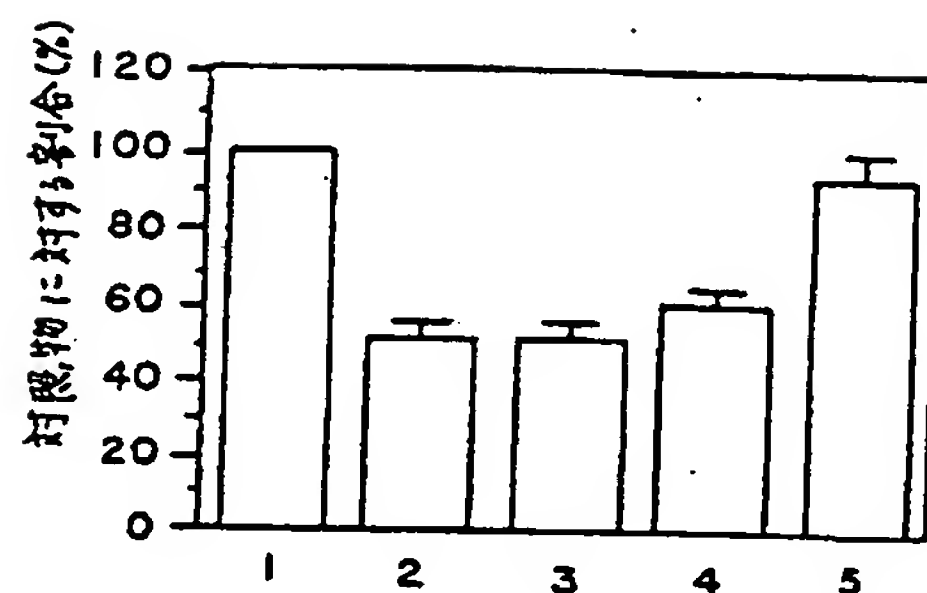


FIG. 3



国際調査報告

International Application No. PCT/US89/03539

IPC (5): A61K 31/70, 31/713, 31/715, 31/717, 31/719, 31/721, 31/723, 31/725, 31/727, 31/729, 31/731, 31/733, 31/735, 31/737, 31/739, 31/741, 31/743, 31/745, 31/747, 31/749, 31/751, 31/753, 31/755, 31/757, 31/759, 31/761, 31/763, 31/765, 31/767, 31/769, 31/771, 31/773, 31/775, 31/777, 31/779, 31/781, 31/783, 31/785, 31/787, 31/789, 31/791, 31/793, 31/795, 31/797, 31/799, 31/801, 31/803, 31/805, 31/807, 31/809, 31/811, 31/813, 31/815, 31/817, 31/819, 31/821, 31/823, 31/825, 31/827, 31/829, 31/831, 31/833, 31/835, 31/837, 31/839, 31/841, 31/843, 31/845, 31/847, 31/849, 31/851, 31/853, 31/855, 31/857, 31/859, 31/861, 31/863, 31/865, 31/867, 31/869, 31/871, 31/873, 31/875, 31/877, 31/879, 31/881, 31/883, 31/885, 31/887, 31/889, 31/891, 31/893, 31/895, 31/897, 31/899, 31/901, 31/903, 31/905, 31/907, 31/909, 31/911, 31/913, 31/915, 31/917, 31/919, 31/921, 31/923, 31/925, 31/927, 31/929, 31/931, 31/933, 31/935, 31/937, 31/939, 31/941, 31/943, 31/945, 31/947, 31/949, 31/951, 31/953, 31/955, 31/957, 31/959, 31/961, 31/963, 31/965, 31/967, 31/969, 31/971, 31/973, 31/975, 31/977, 31/979, 31/981, 31/983, 31/985, 31/987, 31/989, 31/991, 31/993, 31/995, 31/997, 31/999

U.S. CL. 536/21,124; 514/56; 530/387; 210/660; 436/518,536

Documents considered to be relevant:

Category	Category of Document, if not indicated, where 2 documents, of the following designations	Relevant to Class No.
X	US, A, 4,401,662, LORZAU ET AL.	1-3, 5-7, 10
A	30 AUGUST 1983	8,9
X	CASE, (1985) "Structure and Biological Activity of Heparin", Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 43: 51-134 (See entire document)	1-3
A	5-11	5-11
X	Castellot et al., (1986) Journal of Cell Biology, 102: 1979-1984 (See entire document)	11
A	1-3, 5-10	1-3, 5-10
X	Benitz et al., (1986) Journal of Cellular Physiology 127: 1-7 (See entire document)	1-3, 5-11
A	Scott-Burden, et al., TIPS (MARCH 1988) 2: 94-96 (See entire document)	1-3

13 FEBRUARY 1990

02 APR 1990

ISA/US

EVERETT WHITE

International Application No. PCT/US89/03539

FOURTH INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET

Y	X	Y
X	Martini, et al., Biology of Proteoglycan, Academic Press, 1987, p. 301-343 (see pages 310-313)	1-3, 6-11
A	Castellot, et al. (1982), Journal of Biological Chemistry, 257 (19): 11256-11260 (See entire document)	1-3, 5-11
A	Orlidge, et al. (1986), Microvascular Research, 31: 41-53 (See entire document)	1-3, 5-11

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSearchable:

This international search report has been prepared in respect of claims under Article 17(2) of the Patent Cooperation Treaty (PCT) which are not searchable by the International Searching Authority (ISA) for the following reasons:

1. ☐ Claims numbers: because they relate to subject matter not regarded by the ISA as being novel.

2. ☐ Claims numbers: because they relate to claims of the International Searching Authority (ISA) which do not comply with the provisions of Article 17(2) of the PCT.

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS Lacking:

This International Searching Authority (ISA) found multiple inventions in this International Searching Authority (ISA) as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Searching Authority (ISA) has searched all claims of the International Searching Authority (ISA).

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Searching Authority (ISA) has searched only those claims of the International Searching Authority (ISA) for which fees were paid, namely claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Searching Authority (ISA) has searched the claims of the International Searching Authority (ISA) which are not covered by the applicant's fees.

4. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Searching Authority (ISA) has searched all claims of the International Searching Authority (ISA).

5. ☐ The applicant has not paid the required additional search fees.

6. ☐ The applicant has not paid the required additional search fees.

OF DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Citation of Document with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to Claim No.
Y	Pejler, et al. (1988), <u>Journal of Biological Chemistry</u> , 1-5, 12, 13 263 (11): 5197-5201. (See entire document)	
Y	Quo, et al. (1988), <u>Analytical Biochemistry</u> , 168: 54-62 (See entire document)	1,2,5,14,15
A	Austin, et al. (1985), <u>J. Amer. Coll. Cardiol.</u> , 6: 369-375 (See entire document)	1
A	Cloves, et al. (1977), <u>Nature</u> , 261: 625-626 (See entire document)	1,2
A	Benitz, "The Pulmonary Circulation: Normal and Abnormal," Fishman, A.P., ed. University of Pennsylvania Press (1988) (See entire document)	1-3, 5-11

第1頁の続き

⑥Int. Cl. 5

識別記号

片内整理番号

B 01 D	61/24		8014-4D
G 01 N	33/53	V	8310-2J
// A 61 K	49/00	A	8415-4C
B 01 D	15/00	M	8014-4D

優先権主張 ②1989年8月31日③米国(US)④400,661

⑦発明者 ラム, ラン エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95014 クーパーティノ, ノースブルック スクエア 20317

⑦発明者 レイン, ロジャー エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94501 アラミダ, ハシフイツク マリーナ, ナンバー 504, マリーナ ビュー タワーズ
(番地なし)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)